Plant Pathology Bulletin 14:77-88, 2005

論　說

種傳病毒之特性、檢測與管理

張清安

台中縣霧峰鄉 行政院農業委員會 農業試驗所 植物病理組
電子郵件 cachang@wufeng.tari.gov.tw; 傳真：+886-4-23331089

接受日期：中華民國 94 年 2 月 18 日

摘　要

張清安. 2005. 種傳病毒之特性、檢測與管理. 植病會刊 14:77-88.

根據報告已知的植物病毒中共有 108 種具有種子傳播 (seed transmission) 的特性。這些病毒可以藉由極少量的帶毒種子在下一代之植株族群中建立初次感染源，然後再經由媒介生物的二次傳染形成病害的快速流行，而危及作物的生產。在近代的農業歷史經驗中不乏由種傳病毒所導致嚴重損失的例證。種傳特性對於寄主範圍狹窄或缺乏媒介生物的病毒種類而言尤其重要，乃維護其族群能否持續繁衍的關鍵特性。近年來世界各國在植物種源交換上日趨頻繁，種傳特性也是造成病毒透過帶毒種子廣泛散佈的主要原因。為防止種傳病毒病害的流行，發展帶毒種子檢測技術，確定不同批號種子之帶毒比率 (種傳率)，進而預估其可能造成作物損失之潛力與作物生產能夠忍受之種傳率，藉以擬定適當之因應方法，乃近年來農業先進國家針對此類病毒病害所採取之普識對策。目前已知除了少數性質極為穩定之病毒，如蕃茄嵌紋病毒 (*Tomato mosaic virus*, ToMV) 可以在不感染種子胚 (embryo) 組織而僅存在於種皮 (seed coat) 或其他種子組織下尚能造成種傳現象外，絕大多數的種傳病毒都能入侵並感染胚組織，但通常一個感病植株僅有少數種子之胚組織會遭到感染而具有傳毒能力。影響種傳率高低之因素，包括寄主品系 (cultivars) 與年齡 (age)、病毒系統 (virus strains) 及感染時機 (infection stage)。多數種傳病毒均於胚珠受精前即已感染胚珠或花粉，僅有少數是在胚珠受精後才入侵其細胞，因此植株如果在開花後才遭受病毒感染，其種子通常不具傳毒能力。目前最廣為應用之帶毒種子檢測技術為兼具敏感、專一與經濟性之抗血清檢測法，包括酵素連結抗體免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 及組織點漬免疫分析法 (tissue-blot immunoassay, TBIA)。另外敏感度更為優異但效率與成本稍差的反轉錄聚合酵素連鎖反應 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 也於近來被證實可用以偵測種子組織中所存在之微量病毒。晚近更有結合抗體與 RT-PCR 之免疫捕捉聚合酵素連鎖反應 (immunocapture-RT-PCR, IC-RT-PCR) 被應用在種傳病毒之偵測。但不管應用何種偵測方法與流程，其關鍵在於必須能偵測出存在於種子胚組織細胞中具感染活力之病毒顆粒，而不會受到種子中其他組織所存在不具傳染能力之病毒訊息所干擾。因此在發展特定種傳病毒之檢測流程時，必須先釐清病毒存在之位置進而確定種子萃取之方法，以避免獲致錯誤之結論。種傳率之正確檢測可以作為擬定或評估種傳忍受極限 (seed transmission tolerance limit) 之參考，也是近年來先進國家因應種傳病毒病害所積極發展之種子驗證制度 (seed certification) 之關鍵依據。

關鍵詞：病毒、種子傳播、檢測、種傳率

緒　言

病毒病害由於具有可以入侵寄主細胞內且造成全身系統性感染之特性，乃所有病原生物所引起之病害中極難防治的一種 [39]。病毒與其他病原生物間最大的差異在於其不具主動入侵與離開感病寄主之能力[7, 8, 39]，因此病毒必須藉由其他媒介生物之協助才能由感病寄主傳播至另一個個體而達到延續族群的目的。不過在植物病毒的特性中有一項是頗為接近能主動離開已感染之寄主個體而入侵到新個體的能力，那就是有些病毒種類能夠經由寄主開花結實的過程入侵到後代種子胚組織中潛伏 [3, 20, 34]，待這些種子成熟後發芽時種胚細胞內之病毒也隨之活化而開始增殖，這種帶毒種子發芽後即成為感病之幼苗，形成延續與擴張病毒族群之基地。據估計在已知的千餘種植物病毒中約有 108 種病毒具有此種能經由種子傳播之特性 [34]，這種特性對於寄主範圍狹小或不具媒介生物的病毒種類而言特別具有延續族群活命之生態意義，這也可能是病毒在面對自然選汰壓力下進化之結果。以下將以「種傳病毒 (seed-borne viruses)」對此類能經由種子帶毒傳播之病毒種類加以統稱，另以「種傳率 (seed transmission percentage)」代表一批種子中具有種傳能力之種子比率。本文之目的為綜合文獻上已知的種傳病毒種類，及探討病毒如何入侵種子而導致種傳現象之機制，同時也將介紹應用於偵測帶毒種子與界定種傳率之技術方法，最後再討論現階段國際上面對種傳病毒所採取之普識策略。

種傳病毒之種類

最早有關種子傳播病毒之記載出現於 1919 年，二篇發表於美國植物病理學會會刊的報告首次提出病毒可以經由瓜類與菜豆種子帶毒傳播之證據[13, 36]，之後學界便興起探討種傳病毒現象之潮流。直到 1951 年第一篇有關種傳病毒之綜合論述由 Smith 正式提出[40]，根據當時的彙整資料有 8 種病毒具有種傳能力。但隨著國際社會對於種傳病毒研究工作之強化，其後有關種傳病毒之綜合論述便不斷被提出 [3, 20, 34]，到了 1987 年 Agarwal 與Sinclair 二人彙整的結果當時文獻上已有 156 種種傳病毒之記載 [2]。之後 Stace-Smith 與 Hamilton 於 1988 年所提出的報告中宣稱共有 122 種病毒具有種傳能力，其中涵蓋 5 種類病毒 (Viroid) 及 31 種潛隱病毒 (Cryptoviruses) [41]，這份資料後來成為部分病毒學教科書介紹種傳病毒之主要根據 [19]。但是在 1993 年 Mink 所發表的一篇種傳病毒綜合論述中，考證各種種傳病毒之文獻紀錄，將證據錯誤、不足及同種異名之種類加以整理，並且排除了 Stace-Smith 與 Hamilton 所彙整的 5 種 Viroids 及 30 種不具農業經濟重要性之 Cryptoviruses，最後確定共有 108 種分屬於 25 個不同病毒群之種傳病毒存在[34]，這份資料在後續的學者論述中被公認為最正確與最具參考價值之著作[20]。本文中筆者根據 2002 年版台灣植物病害名彙所記錄之病毒種類資料，確認在 Mink 所整理出來的 108 種病毒中有 22 種為正式紀錄曾經發生於我國境內之種傳病毒[18] (表一)。

種子傳播是病毒用以延續與擴張其族群的重要方式。對同一病毒而言，種傳率會隨寄主種類、品系、栽培環境與遭受病毒感染之時期而改變，但可以確定的是沒有一種病毒可以達到 100% 的種傳率[20, 34]。絕大多數的種傳病毒其種傳率通常不高，但種傳率的高低並不與病毒後續對作物之影響嚴重程度成正比。事實上目前許多明顯影響農業經濟之重要病毒病害都被證實是藉由比率極低的種傳率在作物幼苗期形成初次感染源，再藉由媒介生物之二次傳染而造成快速之流行[31]。例如萵苣嵌紋病毒 (*Lettuce mosaic virus*, LMV) 可以經由萵苣種子傳播，雖然萵苣種子傳毒之比率通常很低，但研究結果顯示只要種傳率超過 0.1%，栽培過程中經由蚜蟲的媒介，就足以造成嚴重的 LMV 病害流行，而摧毀整季的萵苣生產[12]。另外研究花生斑紋病毒 (*Peanut mottle virus*, PMoV) 種傳現象之結果也發現，栽培落花生時其種子只要超過 0.1% 的種傳率就可以在一季的栽培後每英畝所收穫之落花生中產出 2 萬個帶毒種子[1]。過去的經驗一再顯示人們常會因為低的種傳率而忽視其可能隱藏的潛在危險，Mikel 等人曾經檢測了 22,189 株的玉米幼苗中才發現其中一株感染玉米矮化嵌紋病毒 (*Maize dwarf mosaic virus*, MDMV)，但如此低的種傳率已足以使 MDMV 在一個新的地區建立族群而且造成流行[33]。另一個明顯例子是玉米黃化斑紋病毒 (*Maize chlorotic mottle virus*, MCMV) 在玉米種子之種傳率只有萬分之四，但已足以讓 MCMV 隨玉米種子之交換在世界各地蔓延[21]。另外美國在 1980 年代遭受落花生條斑病毒 (*Peanut stripe virus*, PStV) 的廣泛危害，追根究底的結果發現 PStV 乃隨當年由中國引進落花生種源時隨帶毒種子入侵[10]。我國落花生在 1978 年以前除了 PMoV 外未曾發現有其他病毒，但幾乎與美國同時也偵測到 PStV 的發生，推測這也是經由國際種源交換而入侵 [7]，筆者後來發現入侵台灣的 PStV 有二種在落花生上造成不同病徵型的系統 ,其中一種引起嚴重壞疽型病徵 (圖一)，與國際上所報導之普通嵌紋型系統有顯著之不同 (圖一)，因此特別將其定名為 PStV Taiwan severe strain 簡稱 PStV-Ts [7]，此系統在台農 4 號落花生品種之種傳率高達 12.5% [7]，值得注意的是其種

表一、我國境內已記錄可能具有種子傳播特性之病毒種類及其可能之寄主作物[1]
Table 1. Viruses reported in Taiwan which may have seed transmissibility [1]

Virus name	Genus	Host plants
Bean yellow mosaic virus	*Potyvirus*	gladiolus, lisianthus, and possibly legume crops
Blackeye cowpea mosaic virus	*Potyvirus*	asparagus bean, azuki bean and other legumes
Broad bean wilt virus	*Fabavirus*	lisianthus, broad bean and pea
Citrus tatter leaf virus	*Capillovirus*	citrus
Cucumber green mottle mosaic virus	*Tobamovirus*	bottlegourd, cucumber, and watermelon
Odontoglossum ringspot virus	*Tobamovirus*	orchids
Cucumber mosaic virus	*Cucumovirus*	more than 9 plant families are susceptible
Hippeastrum mosaic virus	*Potyvirus*	amaryllis
Lettuce mosaic virus	*Potyvirus*	lettuce
Maize dwarf mosaic virus b	*Potyvirus*	corn, sugarcane
Onion yellow dwarf virus	*Potyvirus*	onion, garlic
Pea seed-borne mosaic virus	*Potyvirus*	pea
Peanut mottle virus	*Potyvirus*	peanut and other legumes
Peanut stripe virus	*Potyvirus*	peanut and other legumes
Potato virus Y	*Potyvirus*	tomato, potato and tobacco
Potato virus X	*Potexvirus*	tomato, potato and tobacco
Prunus necrotic ringspot virus	*Ilarvirus*	plum, almond and rose
Soybean mosaic virus	*Potyvirus*	soybean
Strawberry latent ringspot virus	*Nepovirus*	strawberry
Tobacco mosaic virus	*Tobamovirus*	tobacco, tomato and pepper
Tomato aspermy virus	*Cucumovirus*	chrysanthemum
Watermelon mosaic virus	*Potyvirus*	watermelon and other cucurbits

[1] Viruses listed in this table are summarized according to the original data of seed-borne plant viruses reviewed by Mink (1993) and the List of plant diseases in Taiwan [(15)].

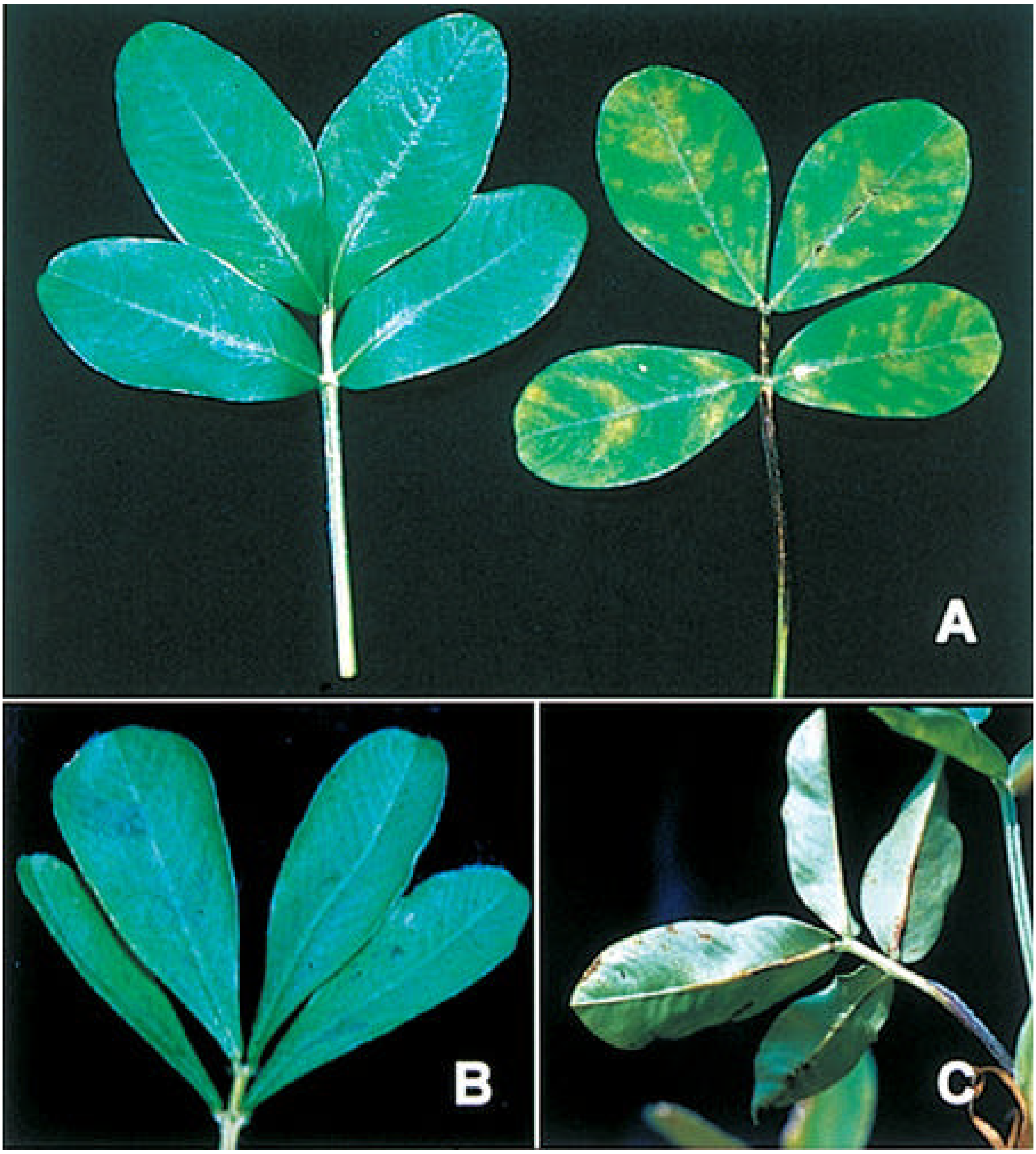
子發芽率 (81.5%) 比較健康無病毒感染植株者 (93.3%) 有下降之趨勢 [(7)]，顯示病毒雖可藉由種子帶毒而傳染，但對於種子之發芽力仍然會產生某些程度之影響。

在台灣由於種傳特性而造成嚴重病害流行的病例應以黑眼豇豆嵌紋病毒 (*Blackeye cowpea mosaic virus*, BlCMV) 與胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV) 複合感染所造成之豇豆皺葉嵌紋病 (cowpea rugose mosaic disease) 最為顯著 (圖二)。這二種病毒均會經由種子帶毒而傳播，但以 BlCMV 之種傳現象較為明顯 (圖二)。筆者曾經調查國內市面上所販售之豇豆種子帶 BlCMV 之比率，結果不同來源之豇豆種傳率介於 1-12.4% 間 [(6)]。但筆者試驗結果發現採自同時接種 BlCMV 與 CMV 之皺葉嵌紋病之豇豆種子其 BlCMV 帶毒率高達 30%，而單獨接種 BlCMV 者帶毒率僅為 10% (張清安，未發表資料)。顯示病毒複合感染後除了有助於病徵之加重與蚜蟲傳播比率之提升外 [(5)]，種子帶毒率也會相對提高，此種狀況更有助於病毒之散佈與族群之建立。此外豌豆種子帶有豌豆種媒嵌紋病毒 (*Pea seed-borne mosaic virus*, PSBMV) 之現象頗為普遍，筆者曾經調查台中 11 號豌豆品系發現其種子中 PSBMV 帶毒率約在 25.4%上下 [(6)]。幸好，PSBMV 單獨感染豌豆時並不會造成明顯病徵，對豌豆之生長影響不大。然而筆者發現帶有 PSBMV 之豌豆如果同時又遭到 CMV 複合感染時，常會引發極為嚴重之病徵，造成植株之萎縮及矮化 [(6)] (圖三)，因此過高的豌豆種傳 PSBMV 比率將會使豌豆遭受其他病毒複合感染之機會提高，對豌豆之栽培仍然潛藏較大之危機。

病毒經由種子傳播之機制

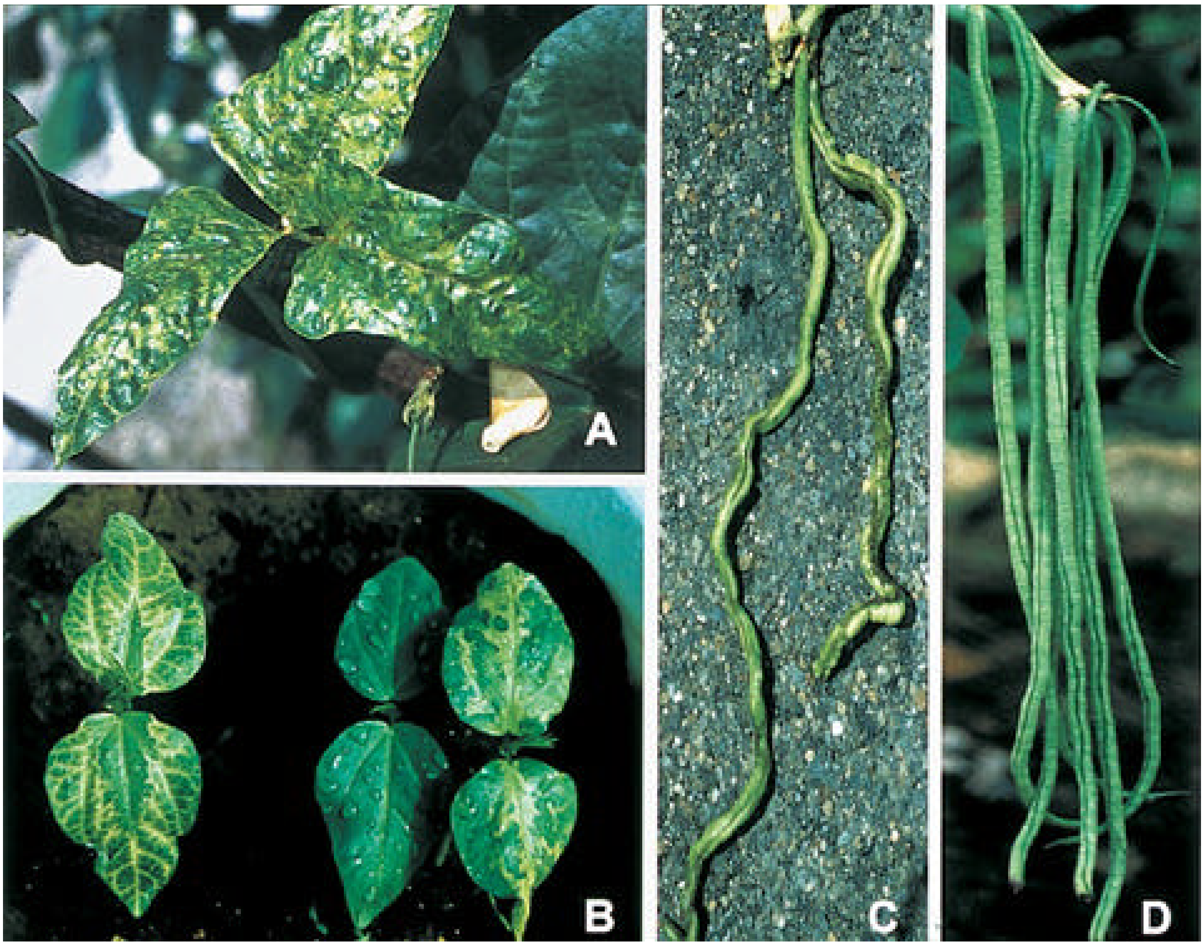
根據近年文獻上幾篇完整之綜合論述，病毒發生種子傳播之機制可分為二大類 [(20)]：

一、病毒僅污染種子外表或其他部位但並未感染胚細胞，當種子發芽，幼根突破種皮時因造成微細傷口，病毒藉機侵入根部細胞造成幼苗感染；或者在種子發芽後當人為移植或其他操作過程中人手或工具污染到存在於種皮上的病毒，而將病毒藉由傷口傳染到幼苗。此類傳播之病毒都屬於性質極其穩定，故能忍



圖一、台灣落花生條斑病毒嚴重型系統於落花生葉片上所造成之黃斑及葉脈壞疽病徵 (A) 及 (C)；一般系統所造成之普通嵌紋型病徵 (B)。
Fig. 1. Yellow spot and vein necrotic symptoms (A, C) induced by *Peanut stripe virus* Taiwan severe strain (PStV-Ts) as compared to the mosaic symptom (B) caused by PStV common strain (PStV-Tc).

受乾燥或低溫等不良環境，且於種子長期保存後仍能保持活性者。此類種傳病毒包括蕃茄嵌紋病毒 (*Tomato mosaic virus*, ToMV)，番椒微嵌紋病毒 (*Pepper mild mottle virus*, PMMV) 及感染瓜類植物之胡瓜綠微斑嵌紋病毒 (*Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV) [20, 34]。另外感染蘭花之齒舌蘭輪斑病毒 (*Odontoglossum ringspot virus*, ORSV) 也被證實可以污染果莢內的絨毛組織，甚至存在種子外表，當蘭花種子無菌播種時這些污染於種皮或絨毛上的病毒可以在無菌培養瓶內存活，並於種子發芽人為移植傳接操作時再藉由傷口入侵，而導致部分幼苗遭受感染 [8]。其實多數病毒在感染過程中均能入侵到種子內部除了胚 (embryo) 以外的組織，但是絕大多數在種子成熟過程中經乾燥或儲藏後均已失去活性，故不具種傳能力。此種現象在大豆嵌



圖二、由黑眼豇豆嵌紋病毒 (*Blackeye cowpea mosaic virus*, BlCMV) 與胡瓜嵌紋病毒複合感染所引起之長豇豆皺葉嵌紋病葉部 (A) 與豆莢畸形病徵 (C)；BlCMV 極易經由種子帶毒而傳播至幼苗，B 圖中左右均為呈現病徵之種傳幼苗，中間者為無病毒幼苗；D 圖為對照健康豆莢。

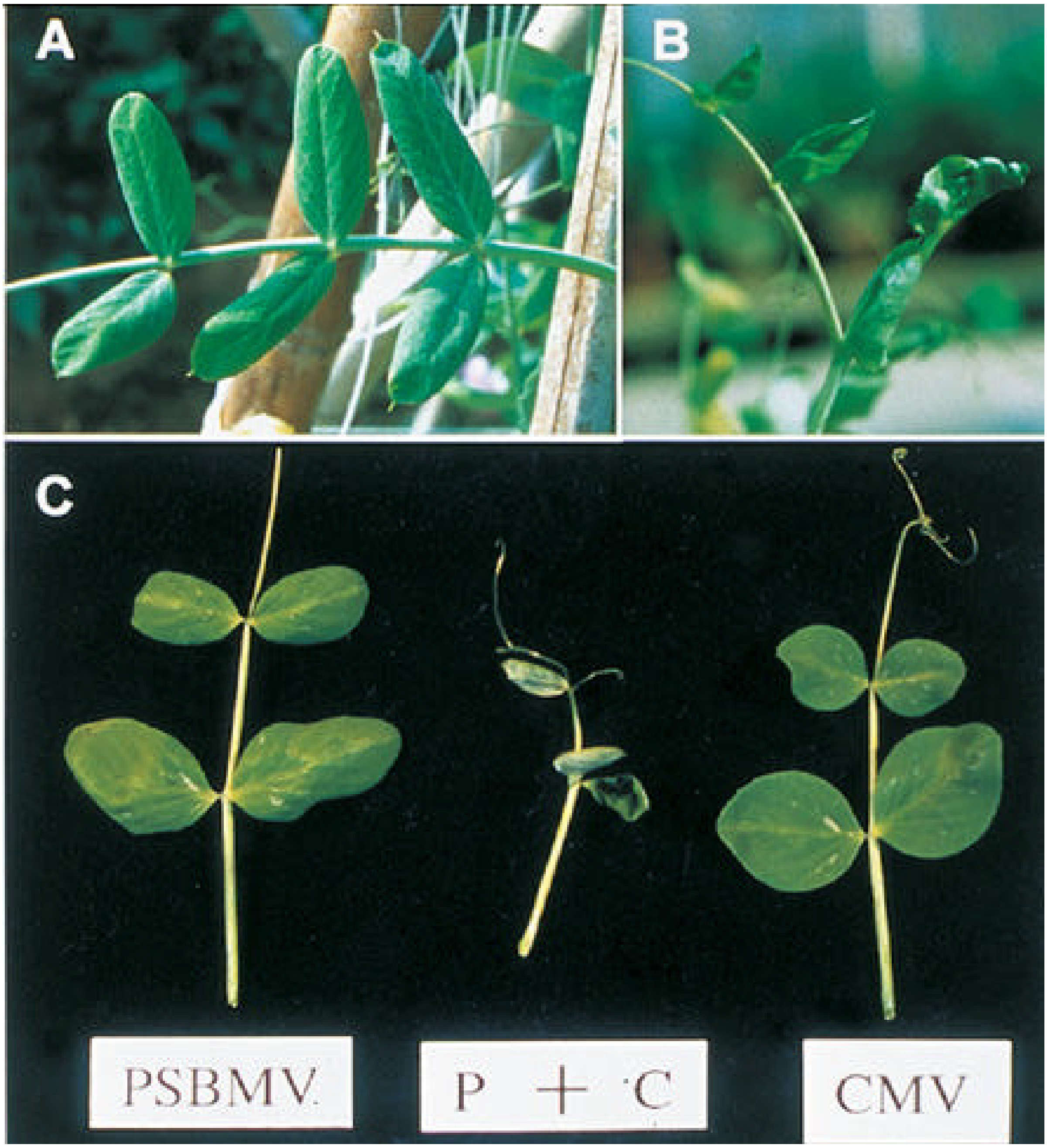
Fig. 2. Foliar rugose mosaic (A) and malformed bean pod symptoms (C) induced by mixed infection of *Blackeye cowpea mosaic virus* (BlCMV) and *Cucumber mosaic virus* (CMV); seed-borne viral symptoms on asparagus bean seedlings are shown on (B); (D) is healthy control asparagus bean pods.

紋病毒 (*Soybean mosaic virus*, SMV) 及前述之 MDMV 上均有發現[20]。

二、多數學者認為前述病毒污染種皮所造成之種傳現象其實只是性質穩定之病毒在幼苗發芽過程中所造成之機械性傳染，並非真正的種子帶毒傳播現象。他們認為必須是病毒可以感染種子胚細胞才屬於真正之種子傳毒[20, 31]。感染種子胚細胞之病毒在種子發芽後隨胚細胞之分裂而增殖最後導致發芽幼苗之感染。絕大多數之種傳病毒都屬於此種傳播機制。至於病毒入侵種子胚細胞之途徑則可分為間接 (indirect embryo invasion) 與直接(direct embryo invasion) 二種[20]。

1. **間接入侵** (indirect embryo invasion)

所謂間接入侵即病毒在寄主植物胚胎形成 (embryogenesis) 前已經感染雌 (胚珠，ovule) 或雄 (花粉母細胞， pollen mother cell) 配子體，待雌雄受精 (fertilization) 後胚組織自然發育成為感病之個體。目前大多數已知之種傳病毒均屬間接入侵者[20]，也就是說病毒必須在寄主花朵受精前已經完成感染，才有可能發生種傳現象。第一種可能情況是胚珠在受精前已遭到病毒感染，則不管所交配之花粉有否感染病毒，受精後均會發育成感病之胚組織。另一種可能情況是胚珠來自健康未感染之親本而與感染病毒之花粉發生受精，病毒藉由花粉管之入侵而感染胚組織形成感病之種子。以目前之瞭解藉由後者方式入侵之種傳病毒例子較少，但至少有部分病毒如豌豆種傳嵌紋病毒 (*Pea seed-borne mosaic virus*, PSbMV) 可藉由此方式傳播至豌豆種子[22]。不過此種感病花粉受精後僅會造成該種子胚組織遭到感染，並不會將病毒平行傳染 (horizontal transmission) 至開花之親本，也就是說不會有花粉傳播 (pollen transmission) 之現象[34]。



圖三、豌豆種媒嵌紋病毒 (*Pea seed-borne mosaic virus*, PSBMV) 所引起之輕微葉部下捲型病徵 (A)；PSBMV 與胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV) 複合感染時會引起嚴重之心葉皺縮嵌紋病徵 (B, C)。

Fig. 3. Mild leaf downward curling symptom induced by *Pea seed-borne mosaic virus* (PSBMV) (A and left of C); severe rugose mosaic symptom caused by mixed infection of PSBMV and *Cucumber mosaic virus* (CMV) (B and middle of C); mild mosaic symptom developed by CMV is shown (right of C).

資料顯示植物的花朵中其胚珠與花粉發育初期與親本組織 (maternal tissue) 仍有微細之維管束組織相連，得以獲得親本之營養供輸，但發育後期彼此相連之維管束即逐漸收縮而產生中斷現象[20]。因此病毒必須在花朵發育初期即已感染寄主方有機會透過早期仍然相連之維管束進入雌雄配子體。這種推論與多年來各方學者發現寄主於開花完成後才遭受病毒感染時並不會發生種傳現象之事實相符[20]。除感染時期可以影響病毒入侵胚組織之時機而左右種傳現象外，Maule 及 Wang (1996) 也發現病毒入侵胚組織之難易與寄主品系有關，某些可以產生高種傳率之豌豆品系其連結胚囊 (embryo sac) 與親本組織之維管束十分發達可以使病毒有較高之機會入侵胚組織[27]。反之在種傳率低之品系中，病毒在離開維管束後之移動即受到限制而無法接

近胚囊。導致此現象之確實機制仍未被釐清，據推斷可能與寄主抗病基因型有關，但此推論仍有待研究證實[27]。不過 Wang 等人利用豌豆早期褐化病毒 (*Pea early browning virus*, PEBV) 所做之研究結果發現如果將 PEBV RNA1 最靠近 3 ' 端的一個 12k 基因加以刪除，將可使 PEBV 完全喪失種子傳毒能力，他們利用免疫細胞學之技術證實 12k 基因缺失病毒無法順利移動分佈到花粉及胚珠，最後導致種傳現象之喪失。由此可知種子傳毒現象也可能受到病毒基因之影響[44]。總之，種子傳毒現象是一種極為複雜之寄主與病毒間之交互作用，而未來對於種傳現象之釐清很可能可以提供吾人探討神秘之植物種胚發育過程之一項有利途徑[27, 43]。

2. **直接入侵** (direct embryo invasion)

直接入侵乃代表病毒在雌雄受精前尚未感染配子體，而是在胚胎形成過程中由周圍感病之親本組織直接入侵胚細胞[20]。根據 Bennet (1969) 的意見過去文獻上所稱病毒可以直接由種子內胚胎外圍組織直接入侵胚細胞之證據並不充分[3]，但 Wang 及 Maule (1992) 發現部分豌豆品種在花朵發育完成後才遭到 PSbMV 感染時仍然會有種傳現象，顯示病毒具有某種機制可以由親本組織直接入侵已經受精之胚珠[42]。他們發現 PSbMV 可以在豌豆種子胚胎受精後由心皮 (carpel) 組織透過一種稱為 suspensor apparatus 之聯繫構造將病毒傳遞至胚細胞中[43]。不過 Wang 及 Maule 的實驗也證明，此種直接入侵胚組織之種傳方式與豌豆品種有密切關係，在一些種傳率低的豌豆品種中大都只能以間接方式在種胚發育初期入侵，唯有極少數高種傳率之品種被發現有直接入侵現象[43]。

種子傳毒比率之檢測

一、病毒在種子內之分佈與種傳率檢測之關係

綜合前人之經驗與研究可以確定種子上帶有病毒並不表示最後發芽後會形成感染病毒之幼苗[20]，因此從病害管理或生態安全之角度上著眼，不管應用任何技術均應以檢測出確實之種子傳毒比率 (seed transmission rate) (換言之，種子發芽後幼苗之感染率) 才具意義。事實上不管能否造成種傳現象，絕大多數病毒在感染過程中均能傳遞到種皮 (testa) 或胚乳組織 (endosperm)，而決定一個病毒是否具有種傳現象乃在於此病毒能否以直接或間接方式成功入侵胚組織[20, 34]。因此在檢測種子之種傳率時應先將待測之種子之胚組織與種皮及胚乳加以分開，再加以檢測；若將整粒種子加以研磨進行病毒檢測，則所獲得之訊號可能是存在於種皮或胚乳組織內屬於不會造成幼苗感染之病毒，而與胚組織內之病毒訊號無法區別，如此結果將與最終之幼苗感染率產生誤差。因此許多文獻均一再提及檢測種子時不可將整粒種子一起研磨，而必須將種胚與種皮加以分開再行檢測，方能獲得正確之種傳率[20, 31]。根據記載檢測大豆種子中的大豆嵌紋病毒 (SMV)[28]、落花生種子中的 PMoV[4]及豌豆種子中的 PSbMV[29]種傳率時，單獨檢測種胚 (embryo) 之結果與種子發芽後幼苗之感染率均達到極高之相關性，因此只要能克服採樣時之複雜度，分離種胚作為檢測對象應是最佳之選擇[31]。不過也有報告指出部分病毒例如黑眼豇豆嵌紋病毒 (*Blackeye cowpea mosaic virus*, BlCMV) 入侵種胚後有時會僅分佈於子葉 (cotyledon) 組織而不會入侵胚軸 (embryo axis)，而且當種子逐漸成熟，存在於子葉中之病毒會漸漸失去活性，最後失去感染幼苗之能力。因此唯有當 BlCMV 感染豇豆後能夠入侵到胚軸組織時，才能導致種子傳播現象。故檢測豇豆種子之 BlCMV種傳率時，若將種胚 (含胚軸與子葉) 取出研磨以抗血清檢測，常會獲致偽陽性之結果，而與真正之幼苗發病率產生之誤差[14, 31]。此種情況下，必須將種子之胚軸與子葉分開再行檢測方能獲致正確之種傳率。相同之現象亦發生在大麥條斑嵌紋病毒 (*Barley stripe mosaic virus*, BSMV) 所感染之大麥種子上[17, 24]。不過許多文獻亦指出有些作物與病毒之組合中當種子成熟後種皮或胚乳上並不會有病毒之累積，例如感染 PStV[46] 與 PMoV[1] 之落花生種子與感染LMV之萵苣種子[15]均有類似之情況，此時只要將整粒種子同時研磨後檢測，即可獲得正確之種傳率[31]。

總之，在進行種子傳毒比率之檢測時必須先考量病毒在種子內各組織部位之分佈，更重要的是必須釐清所偵測之訊號是否為具感染能力之活性病毒，以免獲致不正確之結果[29, 32]。許多文獻更指出，為了分辨病毒之活性，檢測種傳率時必須偶爾配合病毒感染力分析(infectivity assay)，以確定所得結果之正確性[26, 31]。

二、種傳率之檢測技術

1. **酵素連結抗體免疫吸附分析法** (ELISA)

Maury 等人指出基於敏感性 (sensitivity)、方便性 (efficiency)、與經濟性 (cost effectiveness) 的考量，目前已知之病毒檢測技術中屬於血清學技術範疇的 ELISA 是最適合應用於種傳率檢測的技術[31]。許多先進國家已經將 ELISA 發展成為幾近於全自動之檢測系統，除了在樣品之採樣上還必須借重有經驗之工作人

員外，其他步驟均已進入全自動之機械操作系統，檢測結果也能以數位化之數據呈現，並可借重電腦分析、紀錄與儲存。因此 ELISA 可說是現階段國際上面對植物樣品最有效率、最經濟、結果重現性最高，因此也最具公信力之病毒檢測法。加上絕大多數作物之種傳率均低於 1%，當面對此種低種傳率之種子時必須儘量增加樣品重複數，以提升檢測結果之可信度，而當樣品數增加時必須採用檢測效率高之技術才能符合實際之需求，所以 ELISA 便自然成為現階段檢測種傳率之最佳選擇。應用 ELISA 時可以根據前述活性病毒在種子內分佈之分析結果，決定採樣之標的組織與萃取之方法再進行檢測。如果缺乏病毒分佈之基礎資料，亦可將種子播種待發芽後採取幼苗之葉片進行 ELISA 分析，亦可獲得正確之種傳率，但是這樣程序必須有充足之溫網室空間與照顧植物之人力方能進行，對非專業於種子檢定之實驗室而言常有困難。

2. **組織點漬免疫分析法** (tissue blot immunoassay, TBIA)

部分報告指出可使用類似 ELISA 之 TBIA [25]以檢測發芽之種子，此項技術可省略 ELISA 所需之組織萃取步驟，直接將發芽之種子胚軸取下，擠壓於可吸附蛋白質之硝化纖維紙或耐龍紙上，再進行後續與 ELISA 完全相同之免疫偵測。但此技術最後結果之呈現需仰仗人為肉眼之判斷，而無法比照 ELISA 進行結果之數位化與電腦自動分析，因此其結果之研判常會有人為主觀之偏差，而且由於缺乏數據化之佐證，TBIA 之檢測結果公信力與說服力稍差，此乃 TBIA 有待改進之處。

3. **反轉錄聚合酵素連鎖增幅反應** (reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)

近年來有許多研究室應用公認比 ELISA 更加敏感之RT-PCR於帶毒種子之檢測，包括檢測豌豆種子之 PSbMV[23]，羽扇豆種子之胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV)[45]及菜豆種子之菜豆嵌紋病毒 (*Bean common mosaic virus*, BCMV)[38]。不過 RT-PCR 在實際應用上不僅成本偏高，高技術門檻故需由專人負責檢測，乃至今仍無法為產業界接受之主要原因。更重要的是當應用 RT-PCR 於種子檢測時，每一樣品必須經過繁複與昂貴之核酸萃取步驟，所導致之成本增加與不適合面對大量種子樣品之限制，造成目前 RT-PCR 仍只能被應用在專業研究室，而無法為注重效能與成本之產業界所廣泛應用[31]。為了改進 PCR 之效率有實驗室發展出結合免疫與 PCR 之檢測技術，稱為 Immuno-capture RT-PCR (IC- RT-PCR)[35]，此技術之優點在於先以 ELISA 之方式將病毒加以捕捉，然後在省略核酸萃取之步驟下，直接進行 RT-PCR 增幅反應，此種新流程確實可以省下檢測種子所需之核酸萃取步驟之時間與成本，但是比較之結果卻發現此新技術之結果重現性甚至敏感度仍較傳統之 ELISA 為差，因此在廣泛應用前仍有極大之改良空間[31]。不過近年來學界在 RT-PCR 相關檢測技術之效率與成本之改進上均有不錯的成果，未來當 RT-PCR 在檢測效率與成本上達到與 ELISA 相同之等級時，相信以其優異之敏感度必能獲得產業之青睞，成為檢測種傳率之主流技術。

4. **生物分析法** (biological assays)

前述三種種子檢測法都必須建立在對於對象病毒已有完整之掌握的前提下方能進行，尤其在進行 ELISA 或TBIA 時必須要有優質 (專一、敏感、與低背景質) 之病毒抗血清方能獲致穩定與可信任之結果。但對與某些病毒而言，優質之抗血清不易取得，甚至根本無從獲得，此情況下可進行生物分析法，直接將種子播種待發芽後，取幼苗葉片進行指示植物接種 (indicator plant inoculation)，再根據接種後之反應判別幼苗是否感染病毒。此種技術國際上又稱為 Grow-out test [31]，雖然費時費工但由於所得之結果可反應出具有感染力之幼苗比率，事實上是一項頗為可信之檢測技術。但是對於需面對大量種子樣品之專業檢測服務實驗室而言，此技術所需之人力與時間不貲，除非用於與其他高級檢測技術之結果比對外，目前較少被應用。

三、種傳率 (seed transmission rate) 之決定

根據 Maury 等人 (1998) 之報告，面對超過 1% 種傳率之作物種子時可以將每一個別之種子當作一個獨立之樣品，按照前述之原則取出適當之樣品組織進行檢測，如此即可決定出一批種子之種傳率[31]。但若種傳率極低則需借重所謂的群聚篩檢法 (group test) 進行檢測[30]，此時必須先進行先期試驗，探討出如果將多粒種子樣品混和進行檢測時最佳之群聚檢測種子量 (n)，n 就是當只有一粒種子帶毒時，以現行技術仍然可以成功偵測到的最大容許混和種子數量。然後將待檢之種子數依 n 值加以區隔成 N 個群聚 (groups)，然後集合每一群聚內所有之種子樣品共同萃取後成為單一樣品進行檢測，所得結果中未能偵測到病毒反應之群聚數目為 (Y)，則該批種子之種傳率 (P) 即可以下列方程式計算出來[30]。

$$P = 1 - \left(\frac{Y}{N}\right)^{\frac{1}{n}}$$

種子傳毒比率在種傳病毒管理上之應用

經由感病寄主之種子帶毒傳播至後代植株乃許多病毒所具備之延續族群之能力，部分病毒甚至可以藉由極少數之帶毒種子而引發病害之快速流行，造成農作物之重大損失[20, 34]。發展作物種子種傳率之檢測技術可應用 於監測 (surveillance) 種傳病毒之發生，以便適時阻斷(intercept) 新病毒之立足 (establishment) 或已知病毒之流行 (epidemic)。因此種傳病毒之檢測技術可應用於檢疫工作 (quarantine) 上以避免新病毒之入侵，尤其在國際間種源交換或栽培用種子貿易之檢疫上均極為重要[31]。

另外對於某些透過帶毒種子形成初期感染源繼而造成廣泛流行之病毒而言，種傳率之正確檢測可供擬定或評估作物病毒「種傳忍受極限 (seed transmission tolerance limit, STTL)」之參考[31]。STTL 代表每一作物在特定環境 (包括作物對特定病毒之感受性與可能之損失、氣候條件對特定病毒增殖速率與媒介生物傳播效率之影響) 下所能忍受之最低幼苗感染率 (種傳率)[31]。近年來有學者針對不同種傳率之種子栽培後於不同環境下所累積之最終病害流行程度，與對作物所造成之損失程度，發展出動態之模擬模式 (dynamic simulation model)。有人已經成功利用此種預測模組，根據 SMV 在大豆種子之種傳率，而預估出栽培後對大豆產量所可能造成之損失[37]；繼而根據產業可容忍之損失程度，評估出可容忍之最低 SMV 種傳率，此即為大豆嵌紋病毒 (SMV) 之 STTL。

藉由每一作物面對特定病毒之種傳忍受極限(STTL)之訂定，農業行政單位可以研擬出完整之種子驗證制度 (seed certification system)，透過種子驗證制度之執行可以限制超過 STTL 範圍之種子之銷售，或者規範不同 STTL標準之種子之栽培地區，如此將可有效降低種傳病毒病害對作物栽培之衝擊[31]。過去有效應用此套驗證制度對抗病毒病害之顯著例子包括 SMV 與大豆種子之組合及LMV與萵苣種子之組合[31]。中國大陸曾經基於東北地區高蚜蟲密度之考量限制其大豆種子之 SMV 種傳率必須低於 0.01%，而沿海地區由於媒介蚜蟲密度較低則可容許0.05% 之 STTL [16]。在萵苣的例子中，歐洲基於 LMV 在其環境下之流行趨勢，訂定萵苣種子之 LMV 種傳率於0.1% [26]。然而美國則礙於 LMV 在其環境下之高度傳染性，規定每 30,000 粒萵苣商業種子中不得檢出 LMV 之存在[15]。有了這套 STTL 標準與驗證制度後農業單位可以針對不同作物擬定差別性之管理策略。整體而言，除了針對具檢疫風險之新病毒必須訂定最嚴格之零忍受極限 (zero tolerance) 外，對於一般作物與病毒則可訂定較符合環境現實之忍受標準，如此將較能為產業界所接受，也較能付諸實行。不過現階段國際上除了少數作物已經開始執行這種制度外，由於缺乏相關資料與技術之支援，絕大多數之種傳病毒均尚未能實際執行類似之管理措施。

結　論

截至目前為止我國境內已經確定曾經發生之種傳病毒共有 23 種，約佔所有已知的 108 種種傳病毒的 21%，換言之，有八成的種傳病毒尚未入侵我國，或者可能已經入侵而族群偏低尚未被發現。對於這些未入侵或未發現之病毒檢疫單位應該運用檢疫規定與手段，阻斷其可能入侵之途徑。尤其這些病毒具有種傳特性故應該就可能潛藏之作物種子施以隔離檢疫，篩選無病毒之植株再由其上採種作為後續應用之原種，如此才有可能避免可能之病毒入侵。至於國內已經有紀錄曾經發生之種傳病毒，則應建立發生監測體系，即時掌握流行狀況及其對產業之影響，作為擬定因應對策之參考。對於經常發生流行且對作物生產與產業有所影響之病毒種類，例如豇豆上之 BlCMV 與 CMV，蕃茄及甜椒上之 PMMV 及TMV 等病害，未來應根據作物損失忍受程度之評估，訂定各種種傳病毒之種傳忍受極限 (STTL)，繼而建立各種作物種子之驗證制度，以協助產業降低種傳病毒所可能造成之影響。

引用文獻 (LITERATURE CITED)

1. Adams, D. B., and Kuhn, C. W. 1977. Seed transmission of peanut mottle virus in peanut. Phytopathology 67:1126-1129.
2. Agarwal, V. K., and Sinclair, J. B. 1987. Seedborne pathogens. Pages 17-57 *in*: Principles of seed pathology, Boca Raton, CRC Press. 176 pp.
3. Bennt, C. W. 1969. Seed transmission of plant viruses. Adv. Virus Res. 14:221-261.
4. Bharathan, N., Reddy, D. V. R., Rajeshwari, R., Murthy, V. K., and Rao, V. R. 1984. Screening peanut germplasm lines by enzyme-linked immunosorbent assay for seed transmission of peanut mottle virus. Plant Dis. 68:757-758.
5. Chang, C. A. 1983. Rugose mosaic of asparagus bean caused by dual infection with cucumber mosaic virus and blackeye cowpea mosaic virus. Plant Prot. Bull. 25:177-190.
6. Chang, C. A. 1993. Legume viruses in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 2:149-160.
7. Chang, C. A. 1994. Diseases and their management of

ornamental crops cultivated in protected facilities. Pages 265-280 *in*: Techniques of cultivation ornamental crops in protected facilities in the subtropics. Lin, R. S. ed., Special edition No. 47, Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, Taiwan. 300 pp. (in Chinese)

8. Chang, C. A. 2001. Orchid virus diseases. Plant protection technical bulletin series No. 1. Taipei, Bureau of animal and plant health inspection and quarantine, Council of Agriculture, Taiwan. 32 pp. (in Chinese)
9. Chang, C. A., and Liao, Y. Y. 1993. Synergistic effect caused by dual infection of cucumber mosaic virus and potyviruses on pea and lima bean. Plant Pathol. Bull. 2:250. (Abstract)
10. Chang, C. A., Purcifull, D. E., and Zettler, F. W. 1990. A comparison of two strains of peanut stripe virus in Taiwan. Plant Dis. 74:593-596.
11. Demski, J. W., Reddy, D. V. R., Sowell, G. Jr., and Basy, D. 1984. Peanut stripe virus- a new seedborne potyvirus from China infecting groundnut (*Arachis hypogea*). Ann. Appl. Biol. 105:495-501.
12. Dinant, S., and Lot, H. 1992. Lettuce mosaic virus. Plant Pathol. 41:528-542.
13. Doolittle, S. P., and Gilbert, W. W. 1919. Seed transmission of cucurbit mosaic by the wild cucumber. Phytopathology 9:326-327.
14. Gillaspie, Jr., A. G., Hopkins, M. S., and Pinnow, D. L. 1993. Relationship of cowpea seed part infection and seed transmission of blackeye cowpea mosaic potyvirus in cowpea. Plant Dis. 77:875-877.
15. Grogan, R. G. 1983. Lettuce mosaic virus control by use of virus indexed seeds. Seed Sci.&Technol. 11:1043-1049.
16. Guo, J. Q. 1992. The critical levels of seed borne incidence for controlling the damage to soybean caused by soybean mosaic virus. J. Northeast Agric. College 23:227-225.
17. Hamilton, R. I. 1965. An embryo test for detecting seed-borne stripe mosaic virus in barley. Phytopathology 55:798-799.
18. Hsu, S. T., Chang, T. T., Chang, C. A., Tsay, J. L., and Tsay, T. T. 2002. List of plant diseases in Taiwan. Fourth Edition. Taichung, Taiwan Phytopathological Society. 386 pp。(In Chinese)
19. Hull, R. 2002. Trasmission 2: Mechanical, seed, pollen and epidemiology. Pages 533-578 *in*: Matthews' Plant Virology. 4th Edition. Academic Press, U.S.A. 1001 pp.
20. Jensen, S. G., Wysong, D. S., Ball, E. M., and Higley, P. M. 1991. Seed transmission of maize chlorotic mottle virus. Plant Dis. 75:497-498.
21. Johansen. E., Edwards, M. C., and Hampton, R. O. 1994. Seed transmission of viruses:current perspectives. Annu. Rev. Phytopathol. 32:363-386.
22. Kohnen, P. D. 1992. Partial characterization of the P4 pathotype of pea seed-borne mosaic virus. PhD Thesis. Oregon State University, Corvallis, Oregon, USA.
23. Kohnen, P. D., Dougherty, W. G., and Hampton, R. O. 1992. Detection of pea seedborne mosaic potyvirus by sequence specific enzymatic amplification. J. Virol. Methods 37:253-258.
24. Lister, R. M., Caroll, T. W., and Zaske, S. K. 1981. Sensitive serological detection of barley stripe mosaic virus in barley seed. Plant Dis. 65:809-814.
25. Makkouk, K. M., Hsu, H. T., and Kumari, S. G. 1993. Detection of three plant viruses by dot-blot ant tissue-blot immunoassay using chemiluminescent and chromogenic substrates. J. Phytopathol. 139:97-102.
26. Marrou, J., and Messiasen, C. M. 1967. The Chenopodium test: a critical method for detecting seed transmission of lettuce mosaic virus. Proceedings of the Transmission of International Seed Testing Association 32:49-57.
27. Maule, A. J., and Wang, D. 1996. Seed transmission of plant viruses: a lesson in biological complexity. Trends Microbiol. 4:153-158.
28. Maury, Y., and Khetarpal, R. K. 1989. Testing seeds for viruses using ELISA. Pages 31-49 *in*: Perspectives in Phytopathology. V. P. Agnihotri, N. Singh, H. S. Chaubey, U. S. Singh and T. S. Dwivedi, eds. Today and Tomorrow Printers and Publishers, New Delhi, India.
29. Maury, Y., Bossennec, J. M., Boudazin, G., and Duby, C. 1983. The potential of ELISA in testing soybean seed for soybean mosaic virus. Seed Sci.&Technol. 11:491-503.
30. Maury, Y., Bossennec, J. M., Boudazin, G., Hampton, R. O., Pietersen, G., and Maguire, J. D. 1987. Factors influencing ELISA evaluation of transmission of pea seed borne mosaic virus in infected seeds. Agronomie 7:225-230.
31. Maury, Y., Duby, C., and Khetarpal, R. K. 1998. Seed certification for viruses. Pages 237-248 *in*: Plant Virus Disease Control. A. Hadidi, R. K. Khetarpal, and H. Koganezawa, eds., APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. 684 pp.
32. Maury, Y., Duby, C., Bossennec, J. M., and Boudazin, G. 1985. Group analysis using ELISA: determination of the level of transmission of soybean mosaic virus in soybean seed. Agronomie 5:405-415.
33. Mikel, M. A., D’Arcy, C. J., and Ford, R. E. 1984. Seed transmission of maize dwarf mosaic virus in

sweet corn. Phytopath. Z. 110:185-191.
34. Mink, G. I. 1993. Pollen and seed transmitted viruses and viroids. Annu. Rev. Phytopathol. 31:375-402.
35. Phan, T. T. H., Khetarpal, R. K., Lee T. A. H., and Maury, Y. 1996. Comparison of immunocapture-PCR and ELISA in quality control of pea seed borne mosaic virus.in: Seed Health Testing Towards the 21st Century, 2nd ISTA-PDC Symposium, August 5-8, Cambridge, U.K.
36. Reddick, D., and Stewart, V. B. 1919. Transmission of the virus of bean mosaic in seed and observations on thermal death point of seed and virus. Phytopathology 9:445-450.
37. Ruesink, W. G., and Irwin, M. E. 1986. Soybean mosaic virus epidemiology: a model and some implications. Pages 295-313 *in*: Plant Virus Epidemics-Monitoring, Modeling and Predicting Outbreaks. G. D. McLean, R.G. Garrett and W. G. Ruseink, eds. Academic Press, U.S.A.
38. Saiz, M., Castro, S., Blas, C. D., and Romero, J. 1994. Serotype – specific detection of bean common mosaic potyvirus in bean leaf and seed tissue by enzyme amplification. J. Virol. Methods 50:145-154.
39. Shands, H. L., and Stoner, A. K. 1998. Introduction. Page xix. in: Plant Virus Disease Control. A. Hadidi, R. K. Khetarpal, and H. Koganezawa, eds., APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. 684 pp.
40. Smith, K. M. 1951. A latent virus in sugarbeets and marigolds. Nature 167:1061.
41. Stace-Smith, R., and Hamilton, R. I. 1988. Inoculum thresholds of seedborne pathogens: viruses. Phytopathology 78:875-880.
42. Wang, D., and Maule, A. J. 1992. Early embryo invasion as a determinant in pea of the seed transmission of pea seedborne mosaic virus. J. Gen Virol. 73:1615-1627.
43. Wang, D., and Maule, A. J. 1994. A model for seed transmission of a plant virus: Genetic and structural analyses of pea embryo invasion by pea seed-borne mosaic virus. Plant Cell 6:777-787.
44. Wang, D., MacFarlane, S. A., and Maule, A. J. 1997. Viral determinants of pea early browning virus seed transmission in pea. Virology 234:112-117.
45. Wylie, S., Wilson, C. R., Jones, R. A. C., and Jones, M. G. K. 1993. A polymerase chain reaction assay for cucumber mosaic virus in lupin seeds. Aust. J. Agric. Res. 44:41-51.
46. Xu, Z., Chen, K., Zhang, Z., and Chen, J. 1991. Seed transmission of peanut stripe virus in peanut. Plant Dis. 75:723-726.

Chin-An Chang

Dr. Chang is currently working at the Division of Plant Pathology, Agricultural Research Institute, Taiwan. He received both his B. Sc. and M. Sc. in plant pathology from the National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan in 1975 and 1977, respectively. In 1983, he was sponsored by the Council of Agriculture, Executive Yuan, Taiwan to pursue further education in the University of Florida, USA where he obtained his Ph. D. in Plant Pathology in 1986. Dr. Chang's major research interests include plant virus disease diagnosis, identification, taxonomy, indexing, and control of plant viruses. He has involved identification, characterization and indexing techniques development of plant viruses infecting many economically important crops including asparagus bean, pea, peanut, French bean, passionfruit, orchid, tuberose, calla lily, spider lily, lily, and many other ornamental crops in Taiwan. In recent years, he has been actively involving establishment of virus certification system for seed and seedlings of many crops such as asparagus bean, Oncidium and Phalaenopsis orchid. In 2000, he was elected as member of the Council of International Working Group on Ornamental Viruses and convenor of the 11th International Symposium on Virus Diseases of Ornamental Plants which was held at Taichung, Taiwan in 2004.

ABSTRACT

Chang, C. A. 2005. Characteristics, detection and management strategies of seed-transmitted viruses. Plant Pathol. Bull. 14:77-88. (Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute, Wu-Feng, Taichung 413, Taiwan; E-mail: cachang@wufeng.tari.gov.tw)

There have been more than 108 plant viruses documented in the literatures that have seed transmission ability. Infected seeds germinate and become infected seedlings which serve as virus inoculum and subsequently result in an epidemic if there is co-existence of efficient viral vectors. During last century there have been numerous reports of severe losses in crops resulted by seed-borne viruses. Seed transmission is especially crucial for those viruses with restricted host range and those without vectors to survive, disseminate or maintain their population. Viruses with seed transmission abilities are especially capable of long distance transmission. Most literatures agree that seed-transmitted viruses are carried within the embryo of infected seeds. However, there are exceptions, such as tobamoviruses, which are carried as contaminant on the seed surface and can infect seedlings during germination and early growth. In this paper, the mechanisms of virus invasion to the embryonic tissues will be discussed. To control seed-transmitted virus diseases, it is essential to develop sensitive and efficient seed testing techniques to determine seed transmission rate in different seed lots. During last decade, there have been numerous techniques developed especially for seed testing. However, the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) has been recognized as the most suitable seed testing technique and is currently the most widely used one in seed industry. Besides detection technique, sampling the right parts of seed tissue for virus indexing is crucial for obtaining correct seed transmission rate. In this paper, the existence of viruses in different parts of seed tissue in relation to the decision of sampling method is discussed. Finally, various control or management strategies, including the application of seed transmission tolerance limit (STTL), against seed-transmitted viruses will also be summarized and discussed.

Key words: seed-transmitted viruses, seed-borne, seed transmission rate.